

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-128289

(43)公開日 平成6年(1994)5月10日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 9/00	Z N A	8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A D U	8314-4C		

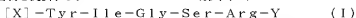
審査請求 未請求 請求項の数(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-280292	(71)出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22)出願日	平成4年(1992)10月19日	(72)発明者	森 英登 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(72)発明者	駒澤 宏幸 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(72)発明者	濱木 育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条西5丁目12 -6
		(74)代理人	弁理士 中村 稔 (外6名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペプチド誘導体およびその用途

(57)【要約】

【目的】 細胞接着性蛋白質であるラミニンの持つ種々の生物活性を充分に保持し、合成も容易でかつ血液中での安定性の高い新規な化合物を提供する。



式中[X]は存在するかあるいは存在しないアミノ酸残基を表し、存在する場合はG l uまたはA s p残基を表す。Yは-NR¹R²を表す。ここでR¹及びR²は水素原子または炭素数1〜4のアルキル基を表す。R¹およびR²は同一でも異なってもよい。

【効果】 本発明のペプチド誘導体は、従来知られてい

【構成】 多糖及びそれに共有結合された下記一般式(I)で表されるペプチドからなるペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

一般式(I)

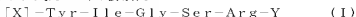
たラミニンのコア配列ペプチドと比較して細胞接着性が大きく、ガン転移抑制作用等の種々の生物活性を充分に保持し、さらに生体に対し重大な副作用をほとんど示さない。さらに合成も容易であり、医薬として価値の高いものである。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多糖及びそれに共有結合された下記一般式(1)で表されるペプチドからなるペプチド誘導体*



式中[X]は存在するかあるいは存在しないアミノ酸残基を表し、存在する場合はGluまたはAsp残基を表す。Yは-NR¹R²を表す。ここでR¹及びR²は水素原子または炭素数1-4のアルキル基を表す。R¹およびR²は同一でも異なってもよい。

【請求項2】 多糖が、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルキチンのいずれかである特許請求の範囲第1項に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。

【請求項3】 薬学上許容できる錠形及び特許請求の範囲第1項あるいは第2項に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を有効成分として含有する、ガン転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はペプチド誘導体に関するものであり、詳しくは多糖と特定の構成を有するペプチドが共有結合したペプチド誘導体またはその薬学上許容可能な塩、およびその用途に関するものである。

【0002】

【従来技術】 ラミニン、フィブロネクチン、ヒトロネクチン等は細胞と結合組織との結合に関与し、また動物細胞の細胞機能に関連した種々の生物活性を有する蛋白質であり、細胞接着性蛋白質と総称される。例えばフィブロネクチンは肝臓で生成され、ヒト血漿中に約0.3 mg/mlの濃度で存在する糖蛋白質である。

【0003】 フィブロネクチンはその1次構造が分子クローニングを用いて決定されており(Koornblit, A. R. et al., EMBO Journal, 4巻, 2519 (1985))、分子量約250 kDのポリペプチドであるA鎖と約240 kDのB鎖がC末端附近でジスルフィド結合した2量体蛋白質であることが明らかにされている。またラミニンについても佐々木ら(Sasaki, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 935 (1987), Sasaki, M. et al., J. Biol. Chem., 262巻, 17111 (1987))によりその1次構造が決定されている。ラミニンはA、B1、B2とよばれる3本のポリペプチド鎖から構成されており、十字架状の構造をとっていることが知られている。

【0004】 そして細胞接着性に関与する結合部位の研究も行われ、フィブロネクチンの細胞接着部のコア配列はArg-Gly-Asp(RGD)なるトリペプチドであることが1984年に報告された(Pierschbacher, M. D. et al., Nature 309巻, 30(1984))。またラミニンの細胞接着部位のコア配列はTyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR)で表わされるペンタペプチドであることも説明されている(Graf, J. et al., C850

*たはその薬学上許容できる塩。

一般式(I)

※ell 48巻, 989 (1987))。

【0005】 これらフィブロネクチンやラミニンは、上記コア配列を介して細胞のレセプターと結合することにより各種の情報を細胞に伝達し、またヘパリン、コラーゲン、フィブリン等の生体高分子とも結合して細胞と結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与しているものと考えられている。

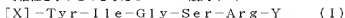
【0006】 このように細胞接着性蛋白質は多様な生物活性を有するため、その活性部位配列ペプチドを用いた研究が情力的になされている。例えばフィブロネクチンの細胞結合部のコア配列の利用としては、ポリマーにRGD配列を有するペプチドを共有結合させ、人工臓器用基体や動物細胞培養用基体として用いる方法(特開平1-309682号公報、特開平1-305960号公報、WO 90/05036号特許)、RGD配列を有するペプチドに疎水性領域を連結することにより目的とするペプチドを固体表面に付着させ、歯科用埋め込み剤や組織培養基体を利用する方法(WO 90/11297号特許)、RGD配列を有する種々の環状及び鎖状オリゴペプチドまたはその環状体を用いて血小板凝集を阻害する方法あるいは血栓症を予防、治療する方法(高分子学会予稿集第38巻, 3149 (1989)、特開平2-174797号公報、特開平3-118330号公報、特開平3-118331号公報、特開平3-118398号公報、特開平3-118397号公報、特開平3-118333号公報、WO 91/01331号特許、WO 91/07429号特許、WO 91/15515号特許、WO 92/00995号特許)、RGDペプチドとヒアルロン酸を共有結合した化合物を用いて血小板凝集を調節する方法(特開平4-134096号公報)、RGD配列を有するペプチドを細胞接着膜として用いる方法(特開平2-4716号公報)、RGD配列を有するペプチドを固定化した膜を細胞接着膜として用いる方法(高分子学会予稿集第37巻, 705 (1988))、RGD配列を有するポリペプチドを体外血液用血小板保護剤として用いる方法(特開昭64-6217号公報)、ポリペプチド分子内に細胞接着活性を有するペプチドを付加することにより人工機能性ポリペプチドとして利用する方法(特開平3-34996号公報)等が開示されている。

【0007】 更に近年、細胞接着性蛋白質はガン転移に関与する生体分子としても注目されてきている。癌転移の一連の段階では、ガン細胞は種々の宿主細胞や生体高分子と接触する。このときフィブロネクチンやラミニンのような細胞接着性分子が存在すると該細胞は多細胞塊を形成し、ガン細胞の増殖や生存が容易になる。ところが、たとえばフィブロネクチンの接着部位コア配列であるトリペプチドRGDが共存すると、競争的に癌細胞上のフィブロネクチンレセプターと結合するため細胞接着がブロックされ、ガン転移阻害作用を示すことが報

告されている (Science 238巻, 467 (1986))。

【0008】しかしながらRGDペプチドはそれぞれ単独では細胞接着活性が充分でないため、効果の増強をはかる目的で該配列を有するオリゴペプチド、環状オリゴペプチド、あるいはその経逆反配列を有するポリペプチドを用いてガン転移を制御する方法 (Int. J. Biol. Macromol., 11巻, 23 (1989)、同誌, 11巻, 226 (1989)、Jpn. J. Cancer Res., 60巻, 722, (1989)、特開平2-174798号公報)、あるいは腫瘍再発を防止する方法 (特開平2-240020号公報) が試みられている。またフィブロネクチン分子中の細胞接着ポリペプチドとヘパリン結合ポリペプチドを構成単位とするポリペプチドを用いてガン転移を抑制する方法 (特開平3-127742号公報) も報告されている。

【0009】一方、ラミニンの接着部位コア配列についても検討が行われており、YIGSR配列を有するペプチド誘導体やYIGSR経逆反配列を有するオリゴ(ポリ)ペプチドを用いて細胞接着やガン転移を制御する方法 (WO 88/06039特許、米国特許出願第87-13919、米国特許出願88-221982、欧州特許出願第82078781号公報、特開平2-174798号公報、特開平3-2196号公報、Iwamoto, I. Science 238巻, 1132 (1987)、Graf, J. Biochemistry 26巻, 6896 (1987)、Mayumi, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 174巻, 1159 (1991)、Mayumi, T. et al., Peptide chemistry 145 (1991)、Tanaka, N.G. et al., Cancer Res., 51巻, 903 (1991)、特表平3-506039号公報)、YIGSRペプチドを固定化したエチレン-アクリル酸共重合体を細胞接着膜として用いる方法 (Nakajima A. et al., Polymer Journal 24巻, 465 (1992)) が開示されている。これらはラミニンへの細胞接着を阻害することによって活性を示すものと考えら*



ここでTyr, Ile, Gly, Ser, Argは、チロシン、イソイチン、グリシン、セリン、アルギニン残基をそれぞれ表す。これらのアミノ酸(グリシンは除く)はD-体、L-体、ラセミ体のいずれでもよいが、好ましくはL-体である。

【0012】式中[X]は存在するかあるいは存在しないアミノ酸残基を表し、存在する場合にはGluまたはAsp残基を表す。なおGlu、Aspはそれぞれグルタミン酸、アスパラギン酸残基を表す。

【0013】Yは $-\text{NR}^1\text{R}^2$ を表す。ここで R^1 および R^2 は水素原子または炭素数1~4のアルキル基を表す。 R^1 および R^2 は同一でも異なってもよいが、炭素数が3または4である場合は分岐構造を有していることが好ましい。このようなYとしては、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}_3\text{H}_7$ 、 $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ 等を挙げる事ができるが、なかでも $-\text{NHC}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{NHC}_3\text{H}_7$ が好ましい。

【0014】本発明で用いられる多糖は、コンドロイチン※50

*されている。またYIGSRペプチド誘導体のコンフォメーション計算を行い、ラミニンコアペプチドの立体構造と生物活性の相関性について述べた論文も報告されている (McKelvey, D. R. et al., J. Protein Chem., 10巻, 265 (1991))。

【0010】【発明が解決しようとする課題】上述のようにラミニン等の細胞接着性蛋白質の活性部位コア配列は様々な生物活性を保持しているため、その応用価値は高いものと考えられる。しかしながら該コア配列の細胞接着活性が未だ充分でないため、それらのガン転移抑制作用は実際の医療に適用するためには満足できるものではなく、この点で更に有効な物質の開発が必要とされていた。そこで本発明者らは細胞接着性蛋白質であるラミニンの持つ種々の生物活性を十分に保持し、合成も容易でかつ血液中での安定性の高い新規な化合物を求めて鋭意検討を行った結果、公知のラミニンコア配列ペプチドに比べてガン転移抑制能が大きい新規なペプチド誘導体を見出し、本発明を完成するに至った。従って本発明の目的は、細胞接着性蛋白質様の活性を十分に保持しており、簡便な手段で合成可能な、血液中での安定性の高い新規なペプチド誘導体を提供することにある。本発明はさらにガン転移阻害活性の高い新規なペプチド誘導体を提供することを目的とする。本発明はさらに上記ペプチド誘導体を含むことになる薬剤組成物の提供も目的とする。

【0011】

【課題を解決する手段】上記課題は、多態に下記一般式(I)で表わされるペプチドが共有結合されてなることを特徴とするペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を見出したことにより達成された。

一般式(I)

※硫酸、ヒアルロン酸、CM-キチン(カルギシメチルキチン)のいずれかであることが好ましい。コンドロイチン硫酸は、ヒトを含む動物の結合組織の細胞外マトリックス中の基質や体液に広く分布している安全性の高い酸性複合多糖であり、サメ、イカ、クジラ等の軟骨などからの抽出物を用いることができる。また硫酸塩の置換度、置換位置、ウロン酸部の構造の差異によりコンドロイチン硫酸A、B、C、D、Eの異性体が存在するが、本発明にはこれらのいずれかを用いることが可能である。本発明に用いられるコンドロイチン硫酸の分子量としては2000~200000の範囲を挙げることができるが、好ましい分子量の範囲は20000~100000の範囲である。

【0015】ヒアルロン酸はN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とからなるムコ多糖であり、コンドロイチン硫酸と同様動物の諸組織、特に間充組織に広く分布しているものである。ヒアルロン酸は既に眼外科や整形外科などの分野で医薬品として利用されており、従来知られている結核、水晶体、膜帯などからの抽出物あるい

5

はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産菌の生産するものを用いることができる。本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量としては2000～500000の範囲を挙げることができるが、好ましくは2000～100000の範囲であることが望ましい。

【0016】CM-キチンはキチンの誘導体の1つであり、C-6位の水酸基がカルボキシメチル基でアルキル化された化合物である。キチンはN-アセチルグルコサミンが β -(1→4)結合により連結した多糖であり、甲殻類や昆虫類の外骨格の主成分として生体の支持や防護の役割を担っている。キチンは最後のバイオマスとも呼ばれ近年その誘導体に関する研究が盛んに行われており、特に溶液に対して可溶性のキチン誘導体に関する研究が報告されている。本発明に用いられるCM-キチンはC-6位水酸基に結合したカルボキシメチル基の効果により水溶性を示すもので、通常キチンをアルカリ的存在下でモノクロロ酢酸によりアルキル化することにより合成することができるが、市販品のCM-キチンを用いることも可能である。またCM-キチンの主鎖上に存在する官能基が硫酸エステル化されている誘導体も好ましく用いることができる。硫酸エステル化する方法としては、例えばクロロホルム酸を反応させる方法等が挙げられる。本発明に用いることが可能なCM-キチンの分子量としては、2000～500000の範囲を挙げることができるが、好ましくは2000～100000の範囲であることが望ましい。

【0017】また本発明のペプチド誘導体中に存在するイオン性基は、適当な対イオンと塩を形成していてもよい(分子内で塩を形成している状態を含む)。塩の状態でもその生物学的活性を十分に維持する。ただしその塩は生理学的、薬理的に許容されるものであることが必要である。具体的には塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩の様な無機酸との塩、酢酸塩、乳酸塩等の有機酸との塩、さらにアンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられるが、なかでも塩酸塩、酢酸塩、ナトリウム塩が好ましい。その様な塩への変換は慣用手段により行うことができる。

【0018】次に本発明のペプチド誘導体の合成法について説明する。本発明のペプチド誘導体は種々の方法でこれを合成することができるが、ペプチド部を合成のちこれを多糖と共有結合させることにより合成する方法が好ましい。ペプチド部の合成方法としては特に限定しないが、固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法、または液相法が挙げられる。固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法に関しては、生化学実験講座・タンパク質の化学IV p.207(日本生化学会編、東京化学同人)、純生化学実験講座・タンパク質の化学(下) p.641(日本生化学会編、東京化学同人)等に記載されている。

【0019】またペプチド部を液相法によって合成する

6

ことも可能である。すなわちC末端成分である保護アミノギニンから出発し、C末端をアミド化したのちN末端保護基を除去し以下保護アミノ酸残基を逐次縮合、最後に脱保護を行う方法である。また[X]-Tyr-Ile-Gly残基とSer-Arg残基の間でフラグメント縮合を行う方法も有効である。なおここで[X]は先に定義した内容と同義である。保護アミノ酸あるいは保護ペプチドを縮合する方法としては、公知の方法、例えば泉屋信夫ら編「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)に記載の方法のなかから適宜選択することができる。縮合反応には種々の方法が知られているが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとDCCを用いるDCC-Additive法、あるいはカルボニルジイミダゾールを用いる縮合法が最も良い結果を与えた。

【0020】保護基の除去の条件は用いている保護基の種類に依存する。通常用いられる方法は、加水素分解、HF処理、トリフルオロメタンスルホン酸/チオアニソール/a-クレゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理等であるが、保護基の種類によってはさらにさまざまな方法も可能であることは言うまでもない。目的とするペプチドは脱保護のち「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)等に記載の公知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィーあるいはゲル透過クロマトグラフィーなどで精製することができる。

【0021】ペプチド部と多糖を共有結合させる方法としては、糖鎖上のカルボキシ基とペプチドのアミノ基との間でのアミド結合形成方法が挙げられる。具体的にはジメチルホルムアミド、ホルムアミドなどの有機溶媒あるいは水性媒体中に多糖を適当な濃度に溶解し、適当な方法によりカルボキシ基を活性化のちペプチドを加え、適当な温度で所要時間反応させる方法を用いることができる。カルボキシ基を活性化する方法としては、臭化シアン、酸アジド、水溶性カルボジイム等を用いる方法が有効である。

【0022】本発明のペプチド誘導体の一般式(1)で表されるペプチドの導入率は約5～50重量%であり、好ましくは10～30重量%である。

【0023】つぎに本発明のペプチド誘導体の作用及び用途について説明する。本発明のペプチド誘導体は細胞接着性蛋白質であるラミニンのコア配列Tyr-Ile-Gly-Ser-Argを有し、該コア配列を介して細胞接着性蛋白質と同様の機序で細胞と接着する。そのため細胞接着性蛋白質のアゴニストあるいはアンタゴニストとして種々の生物活性を有する。すなわち本発明のペプチド誘導体は悪性細胞上のラミニン受容体に作用し、ラミニンへの結合を阻害することにより悪性細胞の接着、コロニー化、破壊的浸食を阻止する。さらに多糖の効果により、細胞表面に存在する糖鎖や細胞外マトリックスとして存在するプロテオグリカン等との相互作用をより強化し、また血中寿命の延長等に効果を発揮して

いるものと考えられる。本発明のペプチド誘導体は乳癌、表皮癌、筋線メラノーマ (muscleline melanoma)、表皮線神経芽細胞腫×グリオマ (epidermal line neuroblastoma x glioma)、軟骨細胞、フィブロザルコーマを含め種々の細胞の接着及び転移を阻止するのに有効である。さらに本発明のペプチド誘導体は創傷治療作用、毛細血管内で起こる癌細胞による血小板凝集の抑制作用等の広範な生物活性が認められた。

【0024】本発明のペプチド誘導体またはその塩は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法によって使用することができ、通常賦形剤を含む薬物組成物として投与される。この薬物組成物はレミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Merck, 16, (1980)) に開示されているように、知られているどのような方法で製造してもよい。賦形剤としては蒸留水、生理食塩水、リン酸塩あるいは酢酸塩の様な緩衝塩類を含む緩衝液、浸透圧調節剤としての塩化ナトリウムやショ糖、若しくはアスコルビン酸の様な酸化防止剤、または許容し得るこれらの組合せがある。

【0025】このような薬物組成物は溶液、錠剤の様な種々の形態とすることができる。投与形態としては経口、経鼻、非経口 (静脈注射、皮下注射、腹腔内投与など) 等から適宜選択することができる。例えば生理食塩水に溶解して注射用製剤としてもよく、あるいは3.0.1規定程度の酢酸緩衝液に溶解したのち凍結乾燥剤としてもよい。またリボソーム中に内包したマイクロカプセル剤あるいはミクロスフェア等の形態で利用することも可能である。

【0026】本発明のペプチド誘導体の投与量は、通常一日0.2 mg/kg体重から200 mg/kg体重の範囲であるが、患者の年齢、体重、症状、投与方法によって決定されるものである。

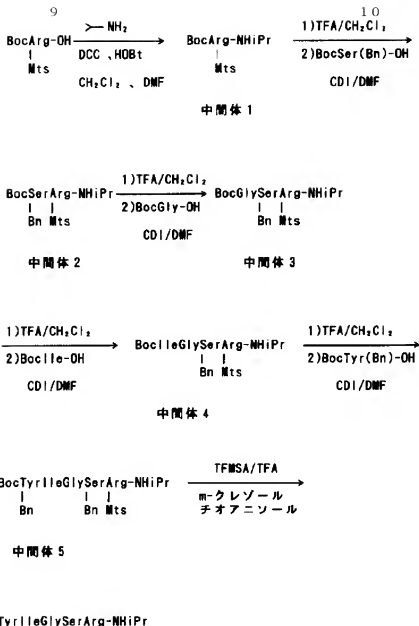
【0027】以下実施例によって本発明を更に詳細に説明する。ペプチド部としてはTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂、Cys-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂及びAsp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂を、多糖部としてはCM-キチン、コンドロイチン硫酸A及びヒアルロン酸を例として挙げ詳細に説明する。ペプチド部の合成経路を以下に示す。なお通常用いられる溶媒や試薬、保護基の表記には以下の略号を使用した。

【0028】

Boc	: t-ブトキシカルボニル
Bn	: ベンジル
Ac	: アセチル
Mts	: メチレンスルホン
HOBT	: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
DCC	: ジシクロヘキシルカルボジイミド
iPr	: イソプロピル
iPrNEt	: ジイソプロピルエチルアミン
DMF	: ジメチルホルムアミド
CDI	: カルボニルジイミダゾール
TFA	: トリフルオロ酢酸
TFMSA	: トリフルオロメタンスルホン酸
THF	: テトラヒドロフラン

【0029】

【化1】



【0030】

【実施例】

実施例1 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHiC₆H₅の合成

1) 中間体1の合成

Boc-Arg(Mts)-OH (25.0 g, 55 mmol)、イソプロピルアミン (3.25 g, 55 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール 1水和物 (8.42 g, 55 mmol)をDMF (30 ml)及び塩化メチレン (30 ml)の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC (11.3 g, 55 mmol)を加えた。反応混合物を氷冷下1時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、セライトを通過して生成した沈殿を除去した。母液を適量の酢酸エチルで希釈し、水、1Mクエン酸溶液、5%炭酸ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して目的とする中間体1を無色粉末として29.0 g (定量的)を得た。

*【0031】2) 中間体2の合成

中間体1 (29.0 g, 55 mmol)の塩化メチレン (70 ml)溶液にトリフルオロ酢酸 (70 ml)を加え、反応混合物を室温で1時間撹拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩27.4 g (97.4%)を無色粉末として得た。一方、Boc-Ser(Bn)-OH (15.93 g, 54 mmol)をDMF (30 ml)に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (8.76 g, 54 mmol)のDMF (60 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間撹拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (27.4 g, 53.6 mmol)とジイソプロピルエチルアミン (7.10 g, 55 mmol)のDMF (45 ml)溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適量の酢酸エチルで希釈し、水、1Mクエン酸溶液、飽和重曹

11

水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮し、目的とする中間体2を無色粉末として3.6.14 g (定量的) 得た。

FAB-MS: (M+H)⁺ 675.

【0032】3) 中間体3の合成

中間体2 (36.14 g, 54 mmol) の塩化メチレン (70 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (70 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩33.2 g (89.3%) を無色粉末として得た。一方、Boc-Gly-OH (8.58 g, 49 mmol) をDMF (30 ml) に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (7.95 g, 49 mmol) のDMF (60 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (3.2 g, 48.3 mmol) とジソプロピルエチルアミン (6.4 g, 50 mmol) のDMF (50 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、1Mクエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち減圧濃縮し、目的とする中間体3を無色粉末として34.87 g (98.8%) 得た。

FAB-MS: (M+H)⁺ 732.

【0033】4) 中間体4の合成

中間体3 (34.8 g, 47.7 mmol) の塩化メチレン (80 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (80 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩34.6 g (97.4%) を無色粉末として得た。一方、Boc-Ile-OH (10.9 g, 47 mmol) をDMF (30 ml) に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (7.62 g, 47 mmol) のDMF (60 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (34.6 g, 46.4 mmol) とジソプロピルエチルアミン (6.33 g, 48 mmol) のDMF (50 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、1Mクエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち減圧濃縮し、目的とする中間体4を無色粉末として38.8 g (定量的) 得た。

FAB-MS: (M+H)⁺ 845.

【0034】5) 中間体5の合成

中間体4 (38.8 g, 47.7 mmol) の塩化メチレン (60 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (60 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩3.8.1 g (95.6%) を無色粉末として得た。一方、Boc-Tyr (8n)-OH (16.5 g, 44.4 mmol) をDMF (35 ml) に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (7.30 g, 45 mmol) の

12

DMF (50 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (38.1 g, 44.4 mmol) とジソプロピルエチルアミン (5.94 g, 46 mmol) のDMF (50 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルから再結晶し、目的とする中間体5を無色結晶として36.51 g (75.0%) 得た。

FAB-MS: (M+H)⁺ 1098.

【0035】6) Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅ の合成
中間体5 (5.02 g, 4.6 mmol) のトリフルオロ酢酸 (20 ml) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (12 g)、チオアニソール (10 ml)、*m*-クレゾール (8.7 ml)、トリフルオロ酢酸 (45 ml) からなる混合溶液を氷冷しながら加え、反応混合物を氷冷下1時間攪拌した。反応液をエーテル (1000 ml) に滴下して30分間ゆっくりに攪拌した。沈殿した粗ペプチドを集めて少量の水にとかし、活性炭処理のちイオン交換クロマトグラフィー (アンバライトIRA-400, (Ac-型) にかけて精製、凍結乾燥して) 目的とするTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅・2酢酸塩を無色粉末として3.0 g (86.4%) 得た。

FAB-MS: (M+H)⁺ 636, (M+Na)⁺ 658.

【0036】実施例2 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅ 連結C-M-キチンの合成

焼津水産化学工業社製のカルボキシメチル化度78%、アセチル化度50%、数平均分子量50,000のC-M-キチン (500 mg) を200 mNリン酸緩衝液 (40 ml, pH 7.4) に溶解し、このものに氷冷しながら水溶性カルボジイミド (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、240 mg) の200 mNリン酸緩衝液 (5 ml, pH 7.4) を加えた。反応混合物を氷冷下1.5時間攪拌したのち、実施例1に記載の方法で合成したTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅・2酢酸塩 (1.3 g) の200 mNリン酸緩衝液 (10 ml, pH 7.4) を加え、反応混合物を氷冷下1時間、更に室温まで昇温しながら24時間攪拌した。反応混合物をセルロース透析膜 (スペクトラポア、分画分子量3500) を用いて透析し未反応の低分子量成分を除いて精製し、さらに凍結乾燥してTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅ 連結C-M-キチンを590 mg得た (化合物1)。アミノ酸分析の結果、ペプチドの導入率は約23% (重量%) であった。

【0037】実施例3 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅ 連結コンドロイチン硫酸Aの合成

生化学工業社製の数平均分子量25,000のコンドロイチン硫酸A (600 mg) を200 mNリン酸緩衝液 (40 ml, pH 7.4) に溶解し、このものに氷冷しながら水溶性カルボジイミド (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド, 200mg) の200 mNリン酸緩衝液 (5 ml, pH 7.4) を加えた。反応混合物を氷冷下1.5時間攪拌したのち、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH-C₆H₅・2酢酸塩 (950

mg)の200 mMリン酸緩衝溶液(10 ml, pH 7.4)を加え、反応混合物を氷冷下1時間、更に室温まで昇温しながら24時間攪拌した。反応混合物をセルロース透析膜(スペクトラポア、分画分子量3500)を用いて透析し未反応の低分子量成分を除いて精製、さらに凍結乾燥してTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH(C₆H₅)₂連結コンドロイチン硫酸Aを940 mg得た(化合物2)。アミノ酸分析の結果、ペプチドの導入率は約34%(重量%)であった。

【0038】実施例4 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH(C₆H₅)₂連結ヒアルロン酸の合成

数平均分子量25,000のヒアルロン酸(100mg)を200 mMリン酸緩衝液(50 ml, pH 7.4)に溶解し、このものに氷冷しながら水溶性カルボジミド(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミド, 200 mg)の200 mMリン酸緩衝溶液(5 ml, pH 7.4)を加えた。反応混合物を氷冷下1.5時間攪拌したのち、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH(C₆H₅)₂・2酢酸塩(900 mg)の200 mMリン酸緩衝溶液(10 ml, pH 7.4)を加え、反応混合物を氷冷下1時間、更に室温まで昇温しながら24時間攪拌した。反応混合物をセルロース透析膜(スペクトラポア、分画分子量3500)を用いて透析し未反応の低分子量成分を除いて精製、凍結乾燥してTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH(C₆H₅)₂連結ヒアルロン酸を120 mg得た(化合物3)。アミノ酸分析の結果、ペプチドの導入率は約13%(重量%)であった。

【0039】実施例5 Asp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃連結C-M-キチンの合成

1) Boc-Arg(Mts)-NHCH₃の合成
Boc-Arg(Mts)-OH(20.0 g, 44 mol)とp-ニトロフェノール(6.12 g, 44 mol)のDMF(15 ml)及び塩化メチレン(15 ml)溶液を氷冷し、これにDCC(9.29 g, 45 mol)を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら6時間攪拌した後セライト濾過して生成した沈殿を除去した。母液を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち減圧濃縮して粗p-ニトロフェニルエステルを得た。これをTHF(100 ml)に溶解し、40%メチルアミン溶液*

* (6 ml)を加えて反応混合物を室温で18時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させて目的とするBoc-Arg(Mts)-NHCH₃を無色粉末として19.4 g(94%)得た。FAB-MS: (M+H)⁺ 470。

【0040】2)以下実施例1に記載の方法に従い、Boc-Arg(Mts)-NHCH₃から保護アミノ酸残基を順次N末端側に縮合してペプチド鎖を伸張した。全保護体を合成したのち脱保護、精製してAsp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃を無色粉末として得た。

10 FAB-MS: (M+H)⁺ 723。

このペプチドを用いて実施例2に記載の方法に従い、Asp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃連結C-M-キチンを得た(化合物4)。アミノ酸分析の結果、ペプチドの導入率は約19%(重量%)であった。

【0041】実施例6 Asp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃連結コンドロイチン硫酸Aの合成

ペプチド部としてAsp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃を、多糖部として実施例3と同じコンドロイチン硫酸Aを用い、実施例3に記載の方法に従いAsp-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH₃連結コンドロイチン硫酸Aを得た(化合物5)。アミノ酸分析の結果、ペプチドの導入率は約31%(重量%)であった。

【0042】実施例7 ガン転移抑制作用に関する実験
本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制作用について、実験的肺転移モデル系によって検討した。実施例1〜6に記載のペプチド誘導体及び比較例としてTyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂及び特開平3-2196号公報に記載のAc-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂を用いた。これらのペプチド誘導体各々1000μgと非常に転移性の強いガン細胞であるB16-B16メラノーマ細胞(対数増殖期のもの5×10⁴)を各々PB 30 20.2ml中で混合し、その0.2 mlを1群5匹のC57BL/6の雌マウスに尾静脈注射した。投与後14日目にマウスをと殺、解剖し、肺に転移した癌のコロニー数を計測して対照のPBS 投与群と比較した。その結果を以下に示す。

【0043】

【表1】

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	177±28	(138-222)
化合物1	17±9	(7-27)**
化合物2	42±8	(33-53)**
化合物3	61±20	(39-91)**
化合物4	54±21	(27-73)**
化合物5	69±11	(58-85)**
Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH ₂	183±28	(136-209)
Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH ₂	106±12	(89-118)*

* t-検定で未処理対照と比較してP<0.01

※50※**

t-検定で未処理対照と比較してP<0.001

【0044】この結果から判る通り、本発明のペプチド誘導体の投与によって腫へのガン転移は顕著に抑制され、本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制効果は比較例化合物より有意に高いものである。

【0045】以上実施例により本発明を特定の例に関して説明したが、限定して解釈されるべきではない。本発明の本質及び範囲から逸脱しない種々の変更や修正が可能であることは明らかである。そしてそのような変更や

修正は本発明に含まれるものである。

【0046】

【発明の効果】以上説明したように本発明のペプチド誘導体は、従来知られていたラミニンのコア配列ペプチドと比較して細胞接着性が大きく、ガン転移抑制作用等の種々の生物活性を充分に保持し、さらに生体に対し重大な副作用をほとんど示さない。さらに合成も容易であり、医薬として価値の高いものである。

フロントページの続き

(72)発明者 東 市郎

北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3-2